

PEDRO PAULO MARTINS DE OLIVEIRA

**USO DE MEMBRANA DE POLI (ÁLCOOL VINÍLICO) -
PVAI COMO SUBSTITUTO PERICÁRDICO -
Trabalho experimental**

CAMPINAS

UNICAMP

2008

PEDRO PAULO MARTINS DE OLIVEIRA

**USO DE MEMBRANA DE POLI (ÁLCOOL VINÍLICO) -
PVAI COMO SUBSTITUDO PERICÁRDICO -
Trabalho experimental**

Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do Título de Doutor em Cirurgia, área de concentração Pesquisa Experimental

ORIENTADOR: PROF. DR. ORLANDO PETRUCCI JR.

CAMPINAS

UNICAMP

2008

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DA FACULDADE
DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

OL4u Oliveira, Pedro Paulo Martins de
Uso de membrana de poli (álcool vinílico) – PVAI como substituto pericárdico – Trabalho Experimental / Pedro Paulo Martins de Oliveira. Campinas, SP: [s.n.], 2008.

Orientador: Orlando Petrucci Júnior
Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Reoperação. 2. Pericárdio. 3. Talco. 4. Hidrogel. 5. Colóide.
I. Petrucci Júnior, Orlando. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

**Título em inglês: Use of polyvinyl alcohol membrane (PVAI) as pericardic substitute -
Experimental Work**

Keywords:

- **Reoperation**
- **Pericardium**
- **Adhesions**
- **Talc**
- **Hydrogel**
- **Polyvinyl alcohol**

Titulação: Doutor em Cirurgia

Área de concentração: Pesquisa Experimental

Banca examinadora:

Prof. Dr. Orlando Petrucci Junior

Profa. Dra. Sônia Maria Malmonge

Profa. Dra. Cecília Amélia de Carvalho Zavaglia

Prof. Dr. Ivan Contrera Toro

Prof. Dr. Luiz Roberto Lopes

Data da defesa: 04 - 09 - 2008

Banca Examinadora da Tese de Doutorado

Pedro Paulo Martins de Oliveira

Orientador: Prof. Dr. Orlando Petrucci Júnior

Membros:

1. Prof. Dr. Orlando Petrucci Júnior - 

2. Profa. Dra. Sônia Maria Malmonge - 

3. Profa. Dra. Cecília Amélia de Carvalho Zavaglia - 

4. Prof. Dr. Ivan Felizardo Contrera Toro - 

5. Prof. Dr. Luiz Roberto Lopes - 

Curso de pós-graduação em Cirurgia, da Faculdade de Ciências Médicas
da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 04/09/2008

Dedicatória

*A meus pais
Acácio e Cida,
por terem me educado dentro dos
valores morais e cristãos
que me norteiam pela vida.*

*À minha esposa
Alexandra,
por ter me dado a
Elisa e
Murilo,
proporcionando-me a felicidade a
cada dia que amanhece.*

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Orlando Petrucci Jr., meu orientador, mas antes de tudo meu amigo de sempre e irmão de coração.

Ao Prof. Dr. Reinaldo Wilson Vieira, poço de sabedoria, por sempre acreditar em mim, incentivando-me diariamente a prosseguir na carreira acadêmica.

Ao Prof. Dr. Domingo Marcolino Braile, por ter me introduzido na carreira acadêmica, sendo meu orientador na dissertação de Mestrado e ter me auxiliado no projeto deste trabalho.

À Profa. Dra. Vanessa Petrilli Bavaresco, por ter me aberto um novo campo de pesquisa por ter fornecido apoio na obtenção das membranas de PVAI e na realização dos procedimentos.

Ao Prof. Dr. André Schenka e Prof. Dr. Norair Salviano dos Reis que fizeram a análise histológica do material.

Aos colegas e amigos: Lindemberg da Mota Silveira Filho, Abrão Abdala, Karlos Alexandre de Sousa Vilarinho, Elaine Soraia Barbosa de Oliveira Severino e Carlos Fernando Lavagnolli, pelo incentivo e por terem cuidado de nossos pacientes quando me dedicava à pesquisa.

Aos biólogos do Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental: Ana Cristina de Moraes, Willian Adalberto Silva, Nilza Alzira Batista e Arnaldo Santos Jr., pelo auxílio na execução dos procedimentos e pela boa vontade que sempre demonstraram em nosso convívio.

À Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, que me formou como médico e cirurgião cardiovascular, empregou-me, possibilitou o meu ingresso na carreira acadêmica onde obtive o título de Mestre e agora me proporciona a oportunidade de obter o título de Doutor, enfim, minha casa.

*“O único lugar onde
o sucesso vem antes do trabalho
é no dicionário”.*

(Albert Einstein, 1879-1955)

*“Aquilo que
guia e arrasta o mundo
não são as máquinas,
mas as idéias”.*

(Victor Hugo, 1802-1855)

	Pág.
RESUMO	xiii
ABSTRACT	xv
INTRODUÇÃO	17
OBJETIVOS	22
MATERIAL E MÉTODO	24
1- Obtenção das membranas de PVAI	25
2- Caracterização das mebranas de PVAI	25
2.1- Ensaio de citotoxicidade	25
2.1.1- Ensaio de citotoxicidade indireta.....	26
2.1.2- Ensaio de citotoxicidade direta.....	27
2.2- Capacidade de absorção de água	27
2.3- Análise da quantidade de cálcio após implante <i>in vivo</i>	28
3- Protocolo experimental	29
3.1- Técnicas anestésicas e cirúrgicas	29
4- Avaliação macroscópica via esteromicroscópio (lupa)	30
5- Avaliação microscópica em microscopia óptica convencional	31
6- Método estatístico	32
RESULTADOS	33
1- Ensaio de citotoxicidade direta e indireta	34
2- Capacidade de absorção de água	35
3- Análise da quantidade de cálcio após implante <i>in vivo</i>	36

4- Análise macroscópica.....	36
5- Análise microscópica.....	37
5.1- Espessura epicárdica.....	37
5.2- Número de células inflamatórias.....	39
6- Observações histológicas.....	40
DISCUSSÃO.....	42
1- Citotoxicidade.....	45
2- Capacidade de absorção de água.....	45
3- Análise da quantidade de cálcio após implante <i>in vivo</i>.....	46
4- Análise macroscópica.....	46
5- Análise microscópica.....	47
6- Considerações finais.....	48
CONCLUSÕES.....	49
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	51
ANEXO.....	57
Anexo 1- Fórmula estrutural do poli (álcool vinílico).....	58

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

Abreviaturas

cm²	Centímetro quadrado
CNT	Controle negativo de citotoxicidade
CPT	Controle positivo
DMSO	Dimetilsulfóxido
kg	Quilograma
kGy	Quilo Gray
ECD	Ensaio de citotoxicidade direta
ECI	Ensaio de citotoxicidade indireta
EWR	<i>Equilibrium water content</i> - Capacidade de absorção de água
et al.	et alii (latin) - e colaboradores
g	gramas
IC	Intervalo de confiança
IL- 8	Interleucina 8
MEV	Mega Eletro Volt
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazolium
nm	nanômetros
PBS	Phosphate buffer saline
PE	Polietileno
p/p	Peso a peso
PTFE	Poli(tetrafluoretileno) expandido
PVAI	Poli (álcool vinílico)
PVPI	Poli (vinilpirrolidona iodo)

SFB	Soro fetal bovino
TGF-β1	Fator de crescimento beta 1
VEGF	Fator de crescimento endotelial

Símbolos

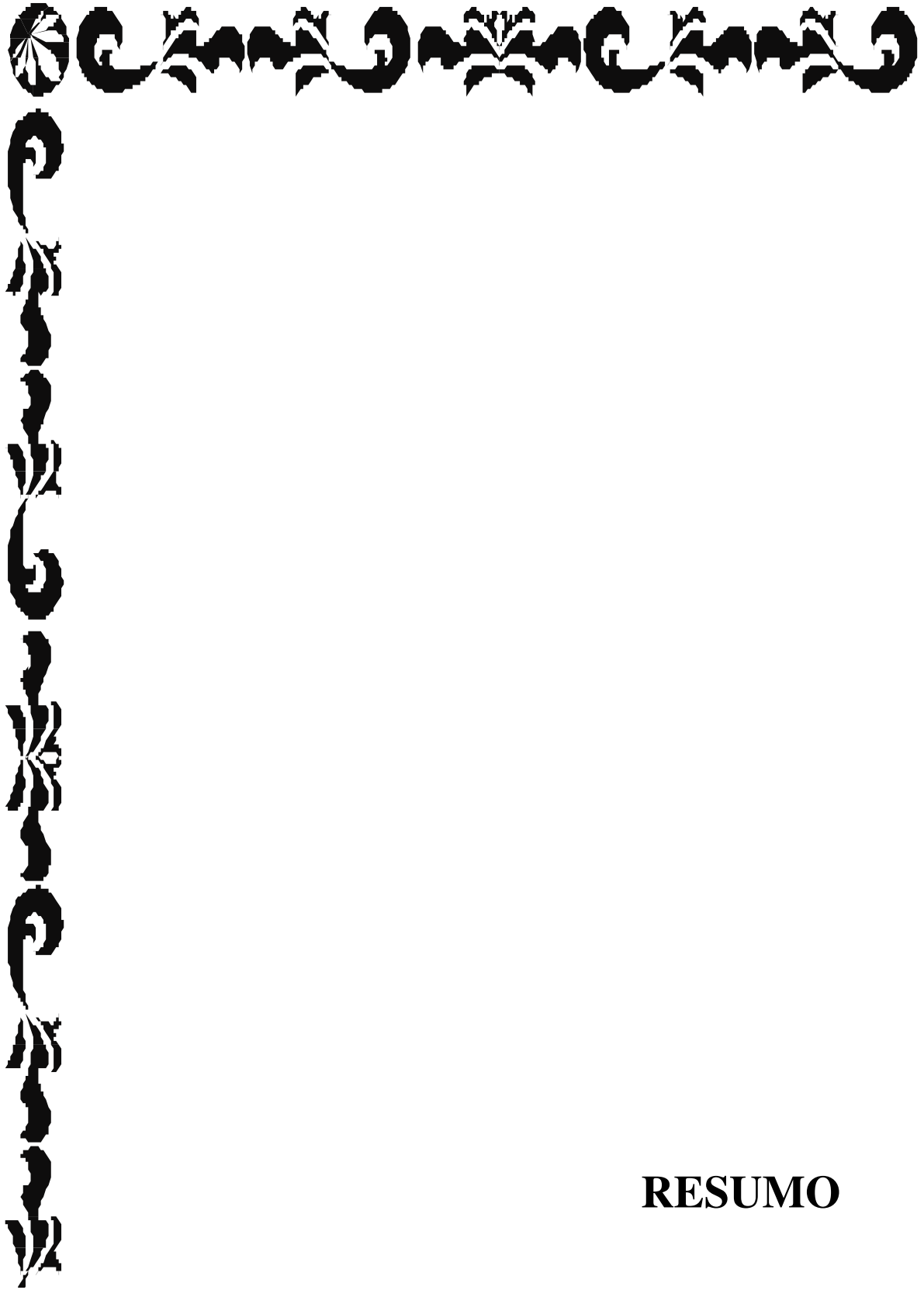
%	Por cento
<	Menor
\pm	Mais ou menos
*	Com significância estatística
®	Marca registrada
°C	Graus Celsius
μl	Microlitros
μm	Micrômetros
m_{gel}	Massa da amostra de hidrogel hidratada
m_i no gel	Massa da amostra de hidrogel hidratada menos a massa da amostra de hidrogel seca

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1 Análise qualitativa das culturas de células.....	35
Figura 2 Corações dos animais após oito semanas de intervenção observados com lupa (aumento de 10X).....	37
Figura 3 Fotomicrografia dos cortes histológicos dos corações corados pelo tricrômio de Masson (objetiva de 10X).....	39
Figura 4 Fotomicrografia dos cortes histológicos dos corações corados pela hematoxilina e eosina (objetiva de 10X).....	41

LISTA DE GRÁFICOS

	Pág.
Gráfico 1 Citotoxicidade direta e indireta da membrana de PVAI.....	34
Gráfico 2 Índice de aderência na observação macroscópica por grupo.....	36
Gráfico 3 Espessuras do epicárdio por grupo.....	38
Gráfico 4 Número de células inflamatórias por grupo.....	40



RESUMO

Introdução: Reoperações representam cerca de 20% das cirurgias cardíacas, quase na totalidade com esternotomia, onde há a formação de aderências entre o coração, esterno e estruturas adjacentes. Lesões das câmaras cardíacas e grandes vasos pela serra esternal ou na dissecação dessas estruturas resultam em aumento da morbimortalidade e do sangramento perioperatório. Vários autores propuseram o uso de substitutos pericárdicos biológicos e sintéticos na tentativa de diminuir o risco de acidentes nas reoperações, porém sem resultados consistentes em longo prazo. A membrana de poli (álcool vinílico) – PVAI reticulado formam um hidrogel bastante estudado como biomaterial, com boa biocompatibilidade e características favoráveis ao seu emprego como substituto pericárdico. **Objetivo:** Caracterizar a membrana de PVAI quanto à capacidade de absorção de água, calcificação e citotoxicidade e estudar o comportamento biológico da mesma como substituto pericárdico. **Metodologia:** Foram utilizadas amostras da membrana de PVAI reticulada por irradiação e realizados ensaios de citotoxicidade em culturas de células VERO, da capacidade de absorção de água e de calcificação após o implante in vivo. Ratos da Raça Wistar foram divididos em quatro grupos: Grupo controle – pericardiotomia. Grupo Talco – colocação de talco sobre o epicárdio. Grupo PVAI – colocada membrana de PVAI circundando o coração. Grupo PVAI + Talco – colocado talco sobre o epicárdio e a membrana de PVAI circundando o coração. Após oito semanas foi realizada análise macroscópica e histológica dos corações. Avaliação estatística foi realizada com análise de variância (ANOVA) e teste de Dunnett com significância $p < 0,05$. **Resultados:** A membrana de PVAI não apresentou citotoxicidade, sua capacidade de absorção de água foi de $42,4 \pm 0,89\%$ e mostrou valor médio de $0,00422 \pm 0,00256\%$ de cálcio da massa total do material analisado. Na análise macroscópica observou-se maior aderência no grupo Talco. Na análise histológica o grupo PVAI + Talco apresentou maior espessura epicárdica. Os grupos T e PVAI + Talco apresentaram maior número de células inflamatórias. **Conclusão:** A membrana não é citotóxica, apresentou boa capacidade de hidratação, a absorção de cálcio foi desprezível, não induziu formação de aderências pericárdicas, não provocou aumento da espessura epicárdica e não induziu aumento de migração de células de resposta inflamatória para o epicárdio, mostrando-se interessante para a aplicação desejada.

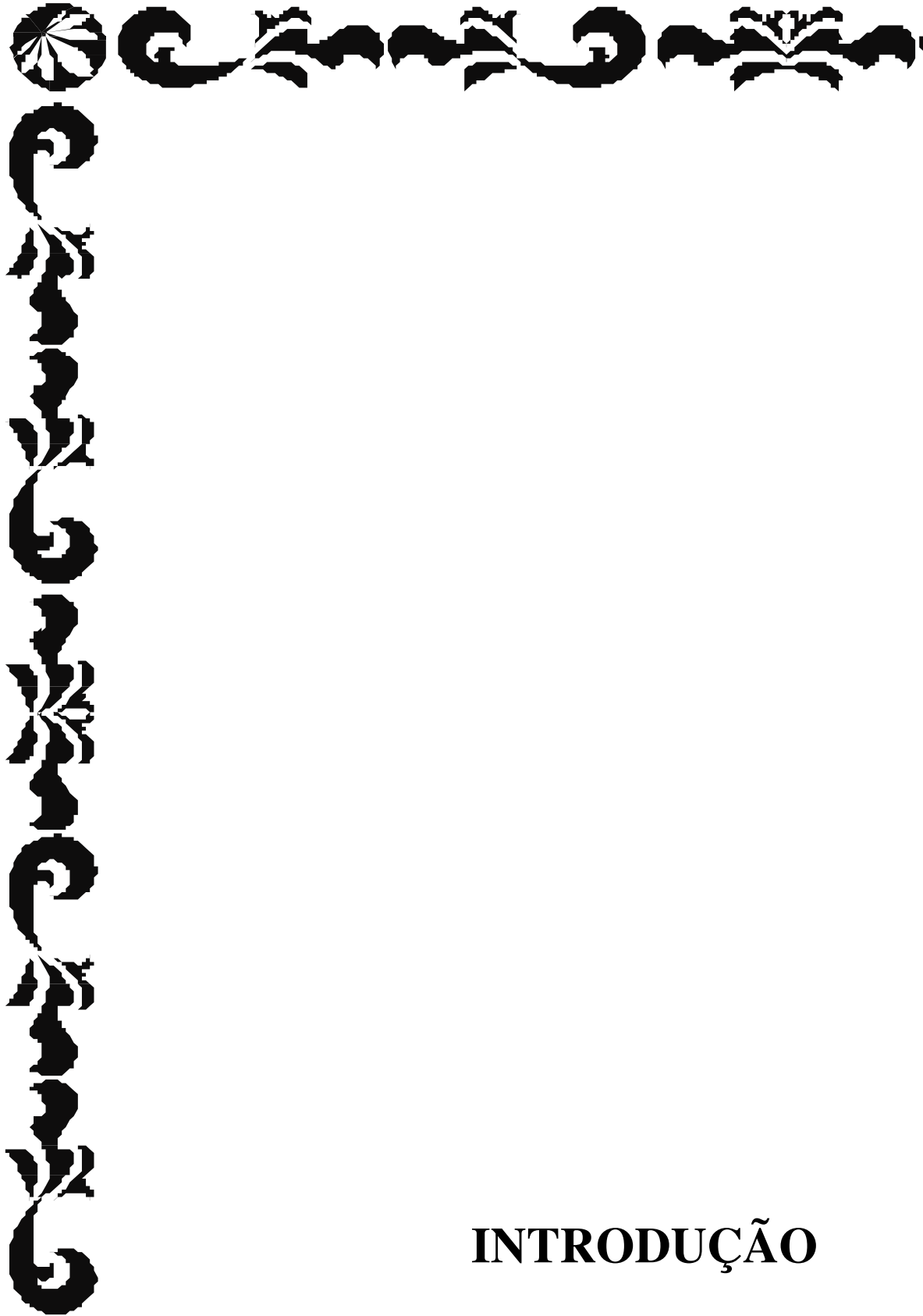
Palavras Chaves: Reoperações, pericárdio, aderências, talco, hidrogel, colóide.



ABSTRACT

Background: Cardiac surgery reoperations represent around 20% of all surgical procedures. The main incision is sternotomy and after the first operation there are adherences joining the heart, sternum and neighboring structures. Cardiac chambers and great vessels lesions caused by sternal saw increase morbidity and mortality as well as perioperative bleeding. Several authors had tried pericardial replacement with biological or synthetic materials in order to decrease risks at reoperations, however with no significant results on long term. Polyvinyl alcohol (PVAI) is a well-known hydrogel, with good biocompatibility and favorable properties as a pericardium replacement. **Objective:** Describe the biological PVAI behavior as a pericardial replacement. **Methodology:** PVAI samples were reticulated by radiation. Cytotoxicity direct and indirect tests with VERO cells were performed. We tested absorption water capability and in vivo calcification. Wistar rats were divided in four groups: Control – pericardium abrasion; Talc - talc insertion surrounding the heart; PVAI membrane – PVAI surrounding the heart; PVAI + talc – talc and PVAI membrane insertion surrounding the heart. All animals were kept for 8 weeks and euthanized for study. Macroscopic and microscopic analyses were performed. Statistical analyses were performed with ANOVA and Dunnett post test. **Results:** The PVAI membrane showed no cytotoxicity. The water absorption capability was $42,4 \pm 0,89\%$. The calcification test showed only $0.00422 \pm 0.00256\%$ of calcium in the total mass of analyzed material. Macroscopic analysis showed higher adherences in the talc group. Histological analysis showed higher epicardium thickness in the PVAI + talc group, higher inflammatory cells in the talcum and PVAI + talc groups. **Conclusion:** The PVAI membrane hasn't cytotoxicity. It has good water absorption capability and calcification was insubstantial. The membrane showed neither adherences formation nor inflammatory response.

Key words: reoperation, pericardium, adhesions, talc, hydrogel, polyvinyl alcohol.



INTRODUÇÃO

Atualmente, a esternotomia total longitudinal mediana é a incisão mais utilizada pelo cirurgião cardiovascular. Após ser introduzida em 1957 por Julian et al. que haviam operado 35 pacientes com esta técnica, a mesma tornou-se consagrada pelas suas inúmeras vantagens tais como acesso amplo ao coração e grandes vasos, facilidade na canulação dos mesmos, não interposição dos pulmões no campo operatório e seu fácil fechamento.

As reoperações representam cerca de 20% dos procedimentos na cirurgia cardíaca contemporânea. Mais de uma reoperação pode ser necessária em alguns pacientes, e em cada uma há maior dificuldade e risco. A formação de aderências retroesternais e intrapericárdicas pós esternotomia é um fenômeno conhecido pelos cirurgiões cardiovasculares sendo causa significativa para o aumento na mortalidade e morbidade (Yau et al.,2000; Tsukiara et al., 2006).

Já em 1969, Brown et al. publicaram suas experiências e complicações em repetidas esternotomias. Macmanus et al.(1975) em sua série de 100 pacientes submetidos a repetidas esternotomias, relataram complicações em 17 casos, havendo lesões de estruturas como artéria aorta, artéria pulmonar e câmaras cardíacas direitas. Chamaram a atenção para que as lesões causadas pela serra para esternotomia, que ocorreram apenas nos pacientes onde o pericárdio não havia sido fechado na operação prévia.

Confirmando os dados de Macmanus et al. (1975), Dobell & Jain (1984) analisando questionários enviados a 131 cirurgiões descreveram que 87% das hemorragias ocorreram quando não houve síntese cirúrgica do pericárdio. A mortalidade variou de 13 a 56% dependendo do local da lesão, que além dos já citados acima incluiu a veia braquiocefálica e os enxertos aortocoronários. No mesmo trabalho citaram técnicas utilizadas pelos vários cirurgiões participantes para evitar as lesões decorrentes de repetidas esternotomias. Isto já havia sido escopo de um artigo de Culliford & Spencer (1979) que propôs um conjunto de medidas para se realizar uma nova esternotomia com segurança.

Além das graves lesões vasculares secundárias à re-esternotomia, existe outro fato a ser destacado: as aderências formadas entre o pericárdio e o epicárdio. Elas dificultam a identificação de estruturas epicárdicas como as artérias coronárias e os enxertos realizados previamente. Muitas vezes há necessidade de dissecação de todo o

epicárdio, resultando em uma grande superfície cruenta que pode causar sangramento no pós-operatório. (Tsukiaha et al., 2006; Revuelta et al., 1985).

A primeira pericardiotomia retira da cavidade pericárdica seu fluido natural que lubrifica as superfícies do epicárdio e do pericárdio. A manipulação do coração durante a operação e a presença de sangue no saco pericárdico desencadeia a formação de aderências fibrosas entre estas duas superfícies. Findada a operação freqüentemente não é possível o fechamento completo do pericárdio, devido ao aumento do volume do coração ou ao fato do pericárdio ter sido excisado e utilizado para reconstrução de alguma estrutura (Wang et al., 2007). Particularmente nos casos de revascularização do miocárdio ou implante de tubos valvados, o fechamento do pericárdio pode provocar distorção ou dobra nos enxertos (Revuelta et al., 1985). Com isto a exposição da superfície anterior do coração, propicia a formação de aderências fibrosas entre as estruturas expostas, o esterno e a parede torácica.

No intuito de possibilitar o fechamento do pericárdio e diminuir a formação das aderências fibrosas entre o coração e as estruturas adjacentes, vários materiais têm sido propostos para tal utilização, porém seus efeitos em longo prazo não foram benéficos ou ainda não são bem conhecidos.

Utilizando materiais biológicos como substitutos pericárdicos, há relatos de uso de fascia lata (Kohanna et al., 1977), dura mater (Bonnabeau et al., 1973), retalho pleural (Schechter et al., 1976), fascia do músculo reto abdominal com peritônio (Pacholewicz et al., 1994), pericárdio porcino (Gallo et al., 1978), pericárdio bovino (Gallo et al., 1982; Gabbay et al., 1989), pericárdio eqüino (Mathinsen et al., 1986) e solução de ácido hialurônico (Mitchell & Lee, 1994).

Há trabalhos referentes à utilização de tecidos sintéticos de vários materiais como substitutos pericárdicos. Podemos citar dacron siliconizado (Mazuji & Lett, 1963), borracha siliconizada (Youmans et al., 1968; Laks et al., 1981), membrana de poli(tetrafluoretileno) expandido - PTFE (Revuelta et al., 1985) e redes de ácido poli(ácido glicólico) (Gabbay et al., 1989). Os autores publicaram seus trabalhos experimentais ou em estudos clínicos em pacientes submetidos a procedimentos paliativos ou corretivos nos quais reoperações seriam necessárias. Muitos resultados preliminares foram favoráveis, contudo não há relatos do seguimento em longo prazo.

Meus et al. (1983) em experimentos com cães compararam borracha siliconizada, PTFE de alta e de baixa porosidade, PTFE siliconizado, filme de polietileno, propileno-etileno fluorinado, poliéster siliconizado, e pericárdio bovino tratado com glutaraldeído ou etanol. Os substitutos pericárdicos protegeram o coração da serra esternal, contudo com todos os materiais sintéticos ocorreu reação com fibrose na superfície epicárdica imediatamente abaixo da membrana. De modo diferente, com o pericárdio bovino, independente do método de preparação, houve mínima formação de aderências em ambas as superfícies, facilitando a abertura do tórax e do saco pericárdico sem danos às estruturas adjacentes. Diferentemente destes autores, Gabbay et al. (1989) descreveram intensa formação de aderências entre o pericárdio bovino e o coração quando os animais foram submetidos à circulação extracorpórea. Sabe-se também que o pericárdio heterólogo pode calcificar, complicando um futuro acesso ao coração (Gallo et al., 1982; Gabbay et al., 1989).

Novos materiais têm sido estudados na tentativa de diminuir a reação tecidual e formação de aderências. Entre os utilizados em trabalhos experimentais podemos citar membranas sintéticas mistas de poliéster e copolímero de silicone-poliuretano (Kajihara et al., 2005) e materiais absorvíveis como membrana de colágeno sintético (Tsukhiara et al., 2006), solução ou filme de diacrilato de polietilenoglicol com derivado de ácido hialurônico (Connors et al., 2007) e a “cola” biológica Bioglue® (Wang et al., 2007).

O polivinil álcool (PVAI) é um hidrogel caracterizado quimicamente como um polihidróxido sintético. Hermann & Haehnel em 1924 foram os pioneiros na sua obtenção, mas somente após a II Guerra Mundial que pesquisadores japoneses estudaram extensivamente suas propriedades básicas e aplicações, principalmente, na tecnologia de filmes e fibras (Peppas, 1987).

Desde a década de 70, o PVAI tem sido extensivamente estudado como biomaterial (Peppas et al., 1977). Sua biocompatibilidade é considerada excelente, tem permeabilidade seletiva a fluidos e substâncias de baixo peso molecular como glicose e proteínas, mas não a células como fibroblastos e leucócitos (Burzac et al. 1994; Young et al., 1996). Adicionalmente o PVA não proporciona adesão de células na sua superfície (Kobayashi et al., 2001).

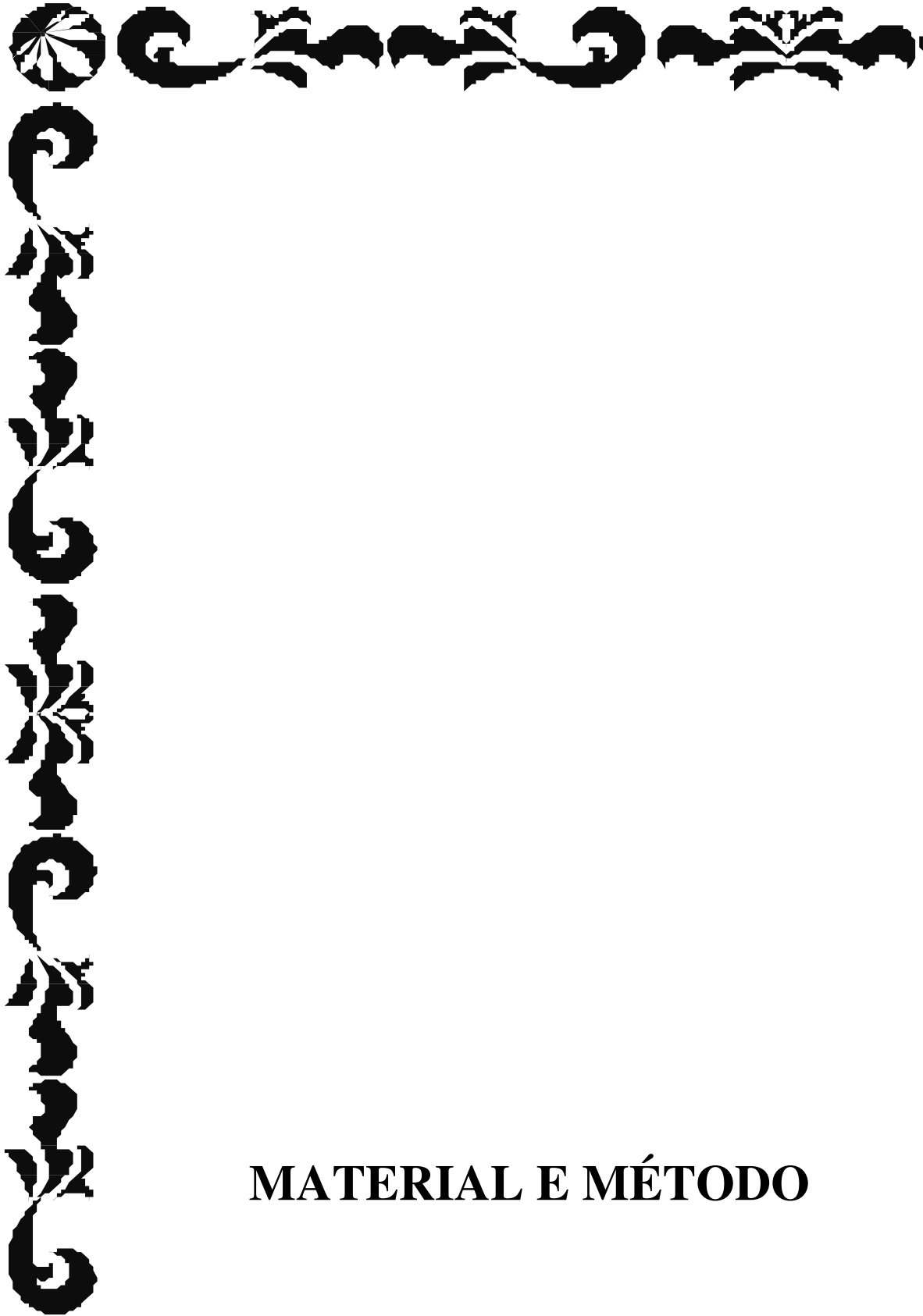
Recentemente várias aplicações biomédicas dos hidrogéis de PVAI têm sido pesquisadas. Podemos citar materiais para cirurgias de reconstrução tendões (bainhas) e de articulações (cartilagens sintéticas) (Kobayashi et al., 2001; Kobayashi et al., 2003), membranas de diálise (Darwis et al., 2002), tubos e outros artefatos que devam estar em contato com o sangue (Oka et al., 2000), suporte para cultura de tecidos, dispositivos controladores de liberação de drogas (Hassan et al., 1999), laringe artificial (Ratner et al., 1981) e prótese valvares cardíacas (Wan et al., 2002; Jiang et al., 2004). Dessa forma, o PVAI é um hidrogel reconhecidamente utilizado em aplicações biomédicas devido às suas propriedades químicas e mecânicas, além de excelente biocompatibilidade (Ratner, 1981).

Do exposto, este trabalho tem o objetivo de estudar o comportamento biológico da membrana de PVAI como substituto pericárdico, verificando a formação de aderências entre o coração e a membrana, assim como os efeitos da mesma sobre o epicárdio.



OBJETIVOS

- Caracterizar a membrana de poli (álcool vinílico) – PVAI quanto à capacidade de absorção de água, calcificação após implante in vivo e citotoxicidade;
- Estudar o comportamento biológico da membrana de poli (álcool vinílico) – PVAI como substituto pericárdico, avaliando a formação de aderências, a espessura e a presença de células de reação inflamatória no epicárdio.



MATERIAL E MÉTODO

O trabalho foi realizado após aprovação na comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) do Instituto de Biologia (IB) da Universidade Estadual de Campinas (Aceite 1127-1), seguindo as determinações do Conselho Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

1- Obtenção das membranas de poli (álcool vinílico) - PVAI

As membranas foram obtidas a partir de soluções aquosas de PVAI (Aldrich Mw 89000-98000 g/mol, 99% hidrolisado) na concentração de polímero em solução de 10% (p/p). Para tanto, 20 ml desta solução foi vertida em placas de Petri de 10 cm de diâmetro. As placas foram deixadas em temperatura ambiente durante uma semana para que o solvente evaporasse.

Após o período de secagem as amostras agora, em forma de membranas, foram submetidas a tratamento químico de acetalização através da sua imersão por 24 horas em uma solução a 60°C contendo formaldeído, ácido sulfúrico e sulfato de sódio anidro na proporção de 60: 50: 300g, respectivamente. As membranas, após tratamento, foram lavadas em água destilada corrente por um período de 24 horas para remoção de resíduos da solução de acetalização sendo acondicionadas hidratadas em água destilada em geladeira até serem submetidas à irradiação (Mondino et al., 1999; Shii et al., 1995). A espessura final das membranas era de 1 mm.

Posteriormente as membranas foram reticuladas no Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN) da Comissão Nacional de Energia Nuclear (CNEN), utilizando-se radiação ionizante de feixe de elétrons (electron beam - EB) emitido por acelerador de elétrons Dynamitron (E = 1,5 MeV) produzido pela Radiation Dynamis, Inc com dose de irradiação de 25kGy. (Bavaresco, 2004).

2- Caracterização das membranas de poli (álcool vinílico) - PVAI

2.1- Ensaios de citotoxicidade das membranas de poli (álcool vinílico) - PVA

Foram utilizadas células VERO, uma linhagem celular do tipo fibroblastos originários de rim de Macaco Verde Africano (*Cercopithecus aethiops*), obtidas junto ao Instituto Adolfo Lutz, localizado na cidade de São Paulo-SP. Estas células foram mantidas

no Laboratório de Cultura Celular do IB da UNICAMP, em meio Ham F-10 (Sigma Chemical Co., St Louis, MO- USA) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB)- Nutricell, Campinas-SP-Brasil- a 37o C. As células VERO são linhagens recomendadas para testes de citotoxicidade e interações com biomateriais (Kirkpatrick, 1992). Foram utilizadas para o desenvolvimento do Ensaio de Citotoxicidade Indireta (ECI) e Ensaio de Citotoxicidade Direta (ECD) das membranas de poli (álcool vinílico) - PVAI.

2.1.1- Ensaio de citotoxicidade indireta (ECI)

As amostras da membrana de PVAI foram trituradas e submersas em meio Ham F-10 com 10% de SFB a 37oC na proporção de 0,2g/ml de meio por 48 horas, para realização do ECI segundo normas internacionais (Kiirkpatrick, 1992; Sjogren et al., 2000). O objetivo é a extração de possíveis substâncias tóxicas solúveis eliminadas pelas amostras. Após a obtenção dos extratos para realização do ECI, uma suspensão celular na concentração de 3×10^5 células/ml foi inoculada em placas de 96 poços (Corning Costar Corporation, Cambridge, MA, USA) e as células cultivadas por 24 horas a 37°C.

Após este procedimento, o meio de cultura presente na placa foi trocado pelos respectivos extratos adquiridos após o período de imersão das membranas. As células foram cultivadas nestas condições por mais um período de 24 horas a 37°C. Foi utilizada como Controle Positivo de Toxidade (CPT) uma solução de meio Ham F-10 com 10% SFB e 10% de Fenol, que é altamente nocivo a células; e como Controle Negativo de Toxidade (CNT) o extrato de poliestireno que não oferece nenhum tipo de interferência ao desenvolvimento celular. Decorrido o período de cultivo de 24 horas, foram feitas imagens para análise qualitativa das células vivas em contraste de fase utilizando Microscópio Invertido Olympus IX-50.

Em seguida, através da utilização do Teste de Viabilidade Celular pelo ensaio com MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazolium) as membranas de PVAI inoculadas na placa de cultura receberam em cada poço 200µl de meio Ham-F10 com 10µl de tampão Hapes e 50µl de MTT Sigma (5µg/ml em PBS - Phosphate Buffer Saline). Este reagente evidencia a mitocôndria de células metabolicamente ativas

demonstrando o número de células viáveis contidas na placa. Após a adição do MTT a placa foi incubada no escuro por quatro horas a 37°C. Decorrido o período de incubação, o meio com o MTT foi removido e 200µl de dimetilsulfóxido (DMSO) mais 25µl de tampão glicina Sorensen pH 10,5 foi adicionado em cada poço para dissolver os cristais formados pelo MTT e conseqüentemente corar as células marcadas por este reagente.

A leitura da absorbância foi feita em leitor de Microplacas Multiskan Bichromatic Version 1.06 Microplate Reader (Labsystems Inc, Helsinki, Finland) em comprimento de onda de 540nm. Foram utilizados como controle de reação poços onde não houve o cultivo de células, mas foram adicionados os mesmos reagentes descritos anteriormente.

2.1.2- Ensaio de citotoxicidade direta (ECD)

Este ensaio visa à observação dos possíveis efeitos deletérios sobre as células a partir do contato direto das mesmas com a superfície do material estudado. Para avaliação do ECD, células VERO foram cultivadas diretamente sobre as membranas em meio Ham F-10 com 10% de SFB a 37° por 24h. Para verificar a atividade celular, após o período de incubação, o meio de cultura foi removido e cada poço recebeu 200µl de meio Ham-F10 com 10mM de tampão Hepes e 50µl de MTT Sigma (5µg/ml em PBS - Phosphate Buffer Saline). A placa foi incubada no escuro por quatro horas a 37°C. Para acessar o número de células viáveis através de leitura de absorbância o MTT foi removido e 200µl de DMSO mais 25µl de Tampão glicina Sorensen pH 10,5 foi adicionado. A leitura das absorbâncias foi feita em leitor de Microplacas Multiskan Bichromatic em comprimento de onda de 540nm e utilizamos como controle de reação, poços onde não houve o cultivo de células. Decorrido o período de cultivo de 24 horas, foram feitas imagens para análise qualitativa das células vivas em contraste de fase utilizando Microscópio Invertido Olympus IX-50.

2.2- Capacidade de absorção de água - (Equilibrium Water Content - EWC)

Para a caracterização quanto à capacidade de absorção de água (EWC), pequenas amostras secas e pesadas foram imersas em água destilada até atingirem peso constante, ou seja, até que a sua capacidade máxima de absorção fosse atingida.

Assim, EWC foi determinado como uma média entre cinco determinações, de acordo com a fórmula:

$$\text{EWC} = \text{mi no gel} / \text{mgel}$$

(mi no gel = massa da amostra de hidrogel hidratada menos a massa da amostra de hidrogel seca e mgel é a massa da amostra de hidrogel hidratada).

2.3- Análise da quantidade de cálcio na membrana após o implante *in vivo*

Para se verificar a ocorrência de calcificação *in vivo* nas membranas de poli (álcool vinílico) - PVAI, o seguinte protocolo foi realizado:

Cinco ratos da raça Wistar, do sexo masculino, de aproximadamente 300g de peso, considerados adultos jovens, foram submetidos a o procedimento de implante de membrana de PVAI (1cm²) no dorso conforme a técnica:

- Indução da anestesia em câmara com oxigênio com vaporização de Halotano na concentração de 3,5% e manutenção da mesma com máscara de oxigênio com vaporização de Halotano na concentração de 3%.
- Tricotomia na região dorsal direita.
- Antissepsia do campo operatório com solução alcoólica de PVPI (polivinilpirrolidona iodo).
- Colocação de campos estéreis.
- Incisão dorsal paramediana no tórax.
- Divulsão do tecido celular subcutâneo.
- Colocação da membrana de PVAI sobre o gradeado costal direito, fixando-o com sutura de fio de polipropileno 5.0.
- Sutura da pele com fio de nylon 3.0.

Terminada a recuperação anestésica os animais foram encaminhados ao biotério, recebendo analgesia com 200mg/kg de paracetamol via oral.

Após quatro semanas os animais foram sacrificados com aprofundamento da anestesia, sendo retiradas as membranas.

A análise da incorporação de cálcio na membrana foi quantitativa, utilizando espectrometria de fluorescência de raios X. Neste método os raios X são emitidos por uma fonte primária de Ródio incidindo sobre a superfície da membrana seca, numa área de dez mm de diâmetro, com penetração da na ordem de 30 microns, analisando a difração dos raios induzida pelo cálcio (Espectrômetro Rigaku, modelo RIX 3100).

3- Protocolo experimental

A ordem de realização dos procedimentos cirúrgicos foi determinada por sorteio.

Foram realizados quatro grupos experimentais, cada um com cinco animais:

- Grupo controle: Os animais foram submetidos à toracotomia paramediana esquerda, com abertura da cavidade pericárdica, seguida do fechamento da toracotomia.
- Grupo talco: Os animais foram submetidos à toracotomia paramediana esquerda, com abertura da cavidade pericárdica e colocação de talco cirúrgico sobre a superfície epicárdica, seguida de fechamento da incisão.
- Grupo PVAI: Os animais foram submetidos à toracotomia paramediana esquerda, com abertura da cavidade pericárdica e envolvimento do coração com a membrana de PVA, seguida de fechamento da incisão.
- Grupo PVAI + talco: Os animais foram submetidos à toracotomia, com abertura da cavidade pericárdica, colocação de talco cirúrgico de granulometria uniforme sobre a superfície epicárdica e envolvimento do coração com a membrana de PVA, seguida de fechamento da incisão.

3.1- Técnicas anestésicas e cirúrgicas

Indução da anestesia em câmara com oxigênio com vaporização de Halotano na concentração de 3,5% e manutenção da mesma com máscara de oxigênio com vaporização de Halotano na concentração de 3%.

- Tricotomia torácica anterior.
- Antissepsia do campo operatório com solução alcoólica de PVPI (polivinipirrolidona iodo).
- Colocação de Campos estéreis.
- Incisão paramediana esquerda no tórax.
- Divulsão do tecido celular subcutâneo.
- Abertura do tórax por secção do quinto arco costal, junto à borda esternal esquerda.
- Exposição da cavidade torácica com afastador auto-estático.
- Abertura da cavidade pericárdica e realização do procedimento proposto (colocação de talco, membrana de PVAI ou PVAI + talco).
- Sutura do plano muscular com fio de algodão 2.0.
- Sutura da pele com fio de nylon 3.0.

Terminada a recuperação anestésica os animais foram encaminhados ao biotério, recebendo analgesia com 200mg/kg de paracetamol via oral.

Após seis semanas os animais foram eutanasiados com aprofundamento da anestesia.

4- Avaliação macroscópica via estereomicroscópio (lupa) com luz incidente

Após o sacrifício dos animais, foi realizada a necrópsia. As amostras foram mantidas em solução fisiológica 0,9% sob temperatura entre 0 e 1°C para evitar a autólise tecidual até o momento da sua visualização. A caracterização macroscópica foi realizada utilizando estereomicroscópio (lupa) modelo Olympus SZ40 com luz incidente com aumento de 40 vezes.

A intensidade da adesão foi graduada numa escala de 0 a 3 de acordo com o critério:

0- Sem aderências.

1- Aderências frouxas que podiam ser separadas facilmente com auxílio de pinças anatômicas.

2- Aderências que necessitavam de divulsão com tesoura para serem separadas.

3- Aderências que necessitavam de secção com tesoura para serem separadas.

Em cada grupo foi realizada uma média dos valores, sendo obtido o índice de aderência.

5- Avaliação histológica em microscopia óptica convencional

Após a fixação em formaldeído a 10% os corações foram seccionados no sentido transversal, em sua porção média, retirando as fatias para inclusão em parafina e preparo das lâminas para avaliação histológica, sendo coradas tanto pela hematoxilina e eosina quanto pelo tricrômio de Masson.

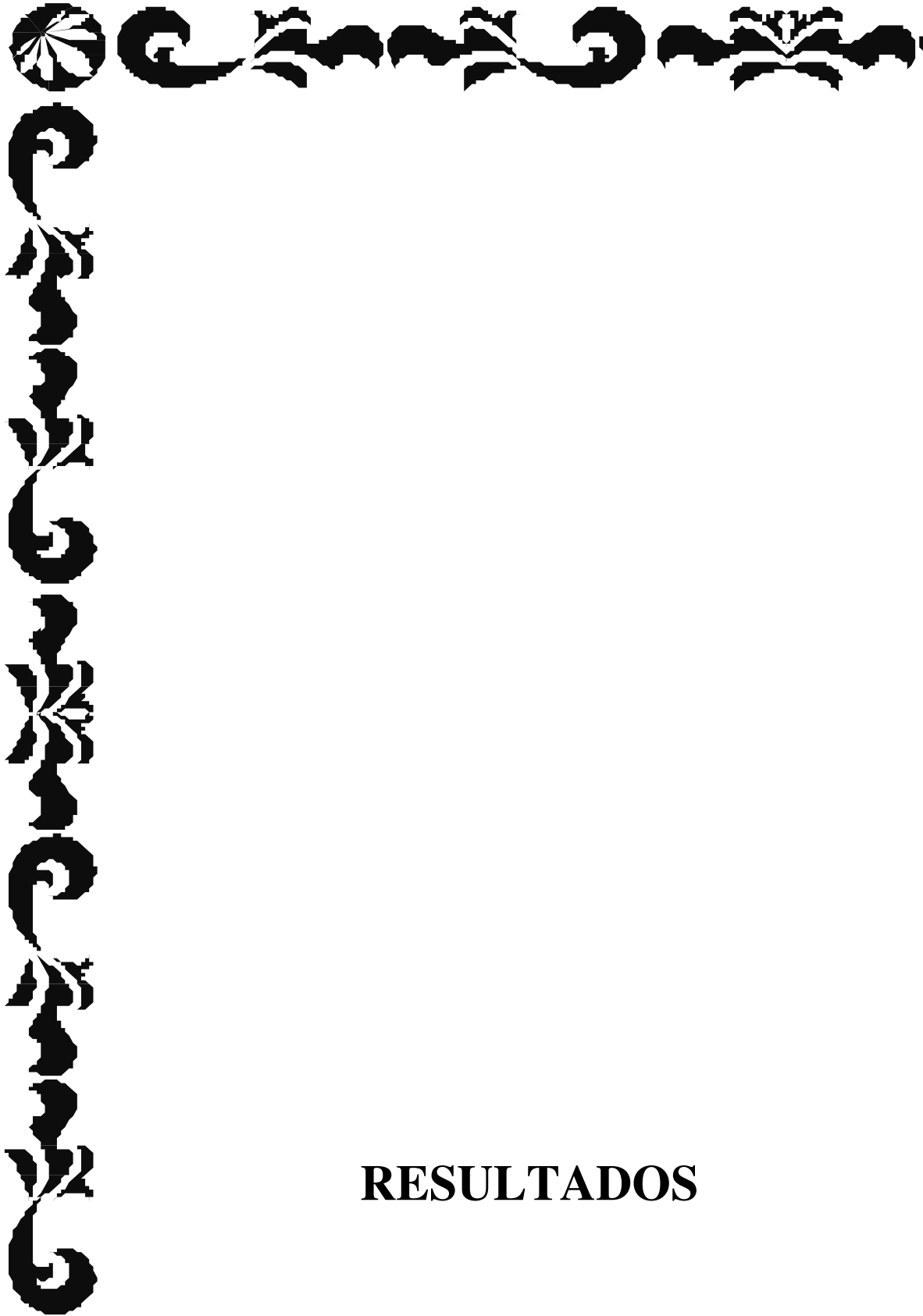
Em cada lâmina corada pela hematoxilina e eosina, de modo aleatório, três campos foram fotografados com câmera digital acoplada ao microscópio convencional com objetiva de 40X sendo feita contagem do número de células de processo inflamatório (linfócitos, plasmócitos, mastócitos e células gigantes) por campo.

Da mesma forma, em cada lâmina corada pelo tricrômio de Masson, de modo aleatório, três campos foram fotografados com câmera digital acoplada ao microscópio convencional com objetiva de 10X, sendo realizada medida da espessura máxima do epicárdio.

6- Método estatístico

Foi utilizado análise de variância (ANOVA) e o teste de Dunnett para detecção entre os grupos. Foi considerado $p < 0,05$ como significante.

Todos os gráficos foram realizados com o software Microcal Origin, versão 5.0 para Windows (Microcal Software Inc., Northampton, MA, USA, www.microcal.com).



RESULTADOS

1- Ensaios de citotoxicidade direta e indireta

O número de células viáveis no grupo controle positivo foi de $167 \pm 26,83$ células (IC 95%: 133,7 a 200,3 células), o do grupo controle negativo foi de $567,4 \pm 35,47$ células (IC 95% 523,4 a $\pm 611,4$ células), o do grupo citotoxicidade direta de $420,8 \pm 38,16$ células (IC 95%: 373,4 a 468,2 células) e o do grupo citotoxicidade indireta de $431,8 \pm 25,29$ células (IC 95%: 400,4 a 463,2 células) (Gráfico1).

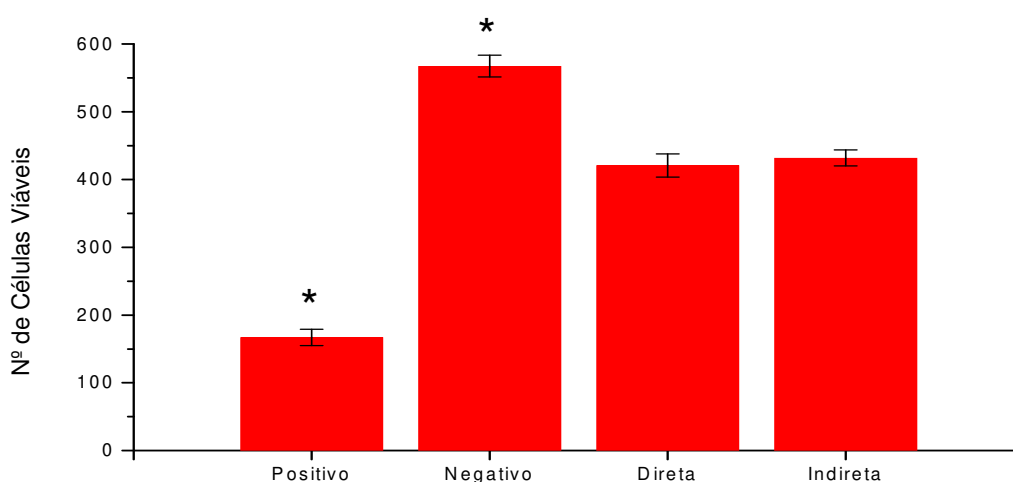


Gráfico 1- Citotoxicidade direta e indireta da membrna de PVAI. Valores expressos em média e dois erros padrão da média. “Positivo” – Ensaio controle positivo. “Negativo” – Ensaio controle negativo. “Direta” – Ensaio de citotoxicidade direta. “Indireta” – Ensaio de citotoxicidade Indireta. (*) diferença com significância estatística aos demais grupos ($p < 0,05$).

Ambos os ensaios de citotoxicidade direta e indireta foram diferentes do controle positivo de citotoxicidade, mostrando que a membrada de PVAI não é citotóxica.

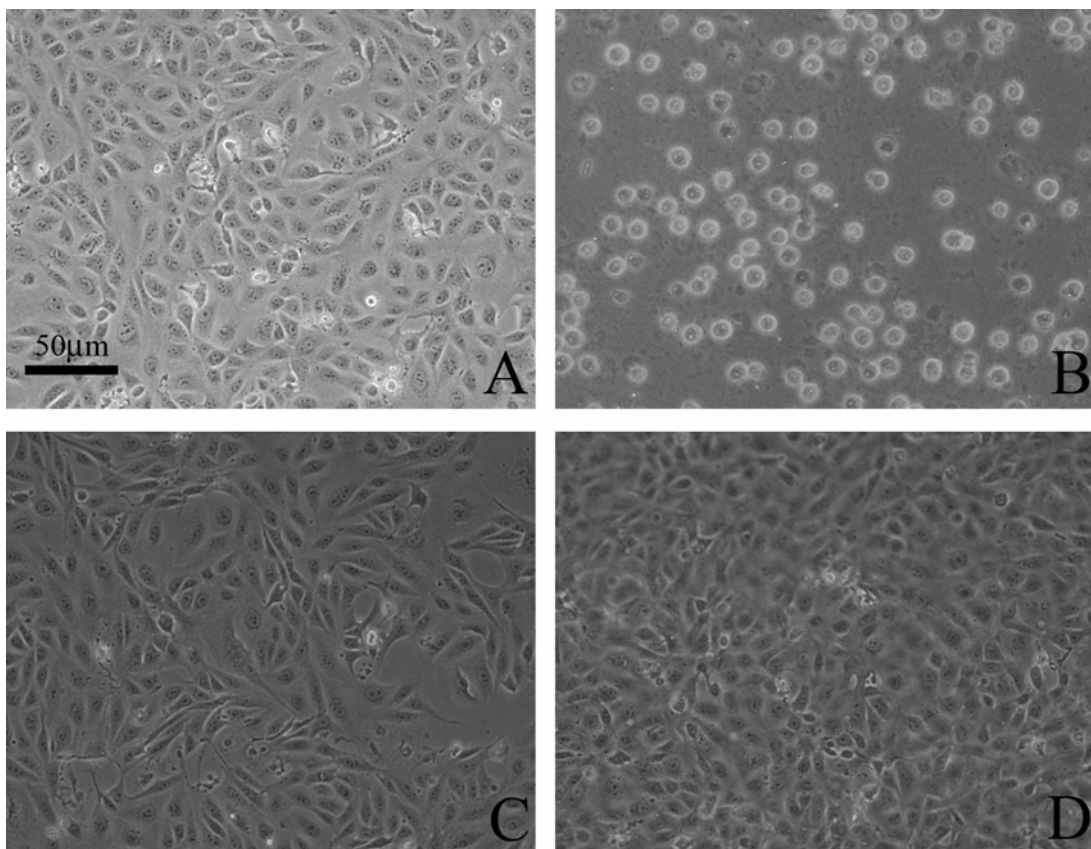


Figura 1- Análise qualitativa das culturas de células. Imagens em contraste de fase utilizando Microscópio Invertido Olympus IX-50. **(A)** controle negativo; **(B)** controle positivo; **(C)** citotoxicidade indireta do PVA; **(D)** citotoxicidade direta do PVAI.

Observar a semelhança dos ensaios de citotoxicidade direta e indireta da membrana de PVAI com o ensaio controle negativo, o que reforça a ausência de citotoxicidade.

2- Capacidade de absorção de água (Equilibrium Water Content - EWC) da membrana de PVAI

A análise da capacidade de absorção de água das membranas de PVAI por gravimetria em cinco amostras mostrou valor médio de 42,4% \pm 0,89% (IC 95%: 41.29 a 43.51%).

3- Análise da quantidade de cálcio da membrana de PVAI após 28 dias de implante *in vivo*

A análise de cinco amostras após 28 dias de implante no subcutâneo demonstrou um valor médio de $0,00422 \pm 0,00256$ % de cálcio da massa total no material analisado (IC 95%: 0,00124 a 0,00760% da massa total).

4- Análise macroscópica da aderência

O índice médio de aderência do grupo controle foi de $0,85 \pm 0,84$ (IC 95%: -0,24 a 1,84), a do grupo talco de $2,4 \pm 0,89$ (IC 95%: 1,29 a 3,5), a do grupo PVAI de zero \pm zero (IC 95%: zero a zero) e a do grupo PVAI + talco de $0,6 \pm 0,89$ (IC 95%: -0,51 a 1,71) (Gráfico 2).

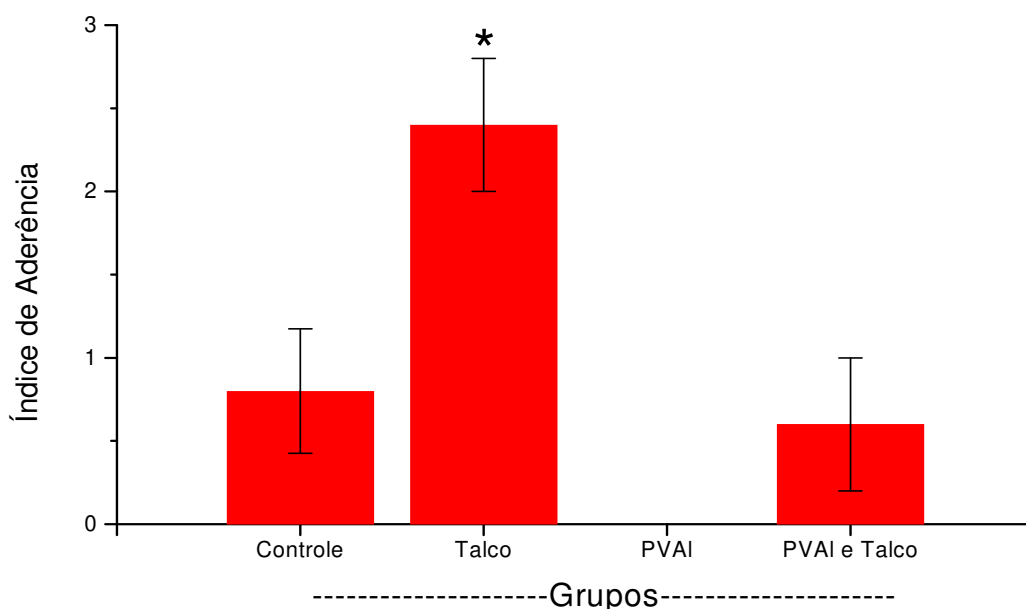


Gráfico 2- Índice de aderência na observação macroscópica por grupo. Valores expressos em média e dois erros padrão da média. (*) diferença com significância estatística em relação ao grupo controle ($p < 0,05$).

Como demonstrado no gráfico acima, houve diferença com significância estatística apenas do grupo talco em relação ao grupo controle.

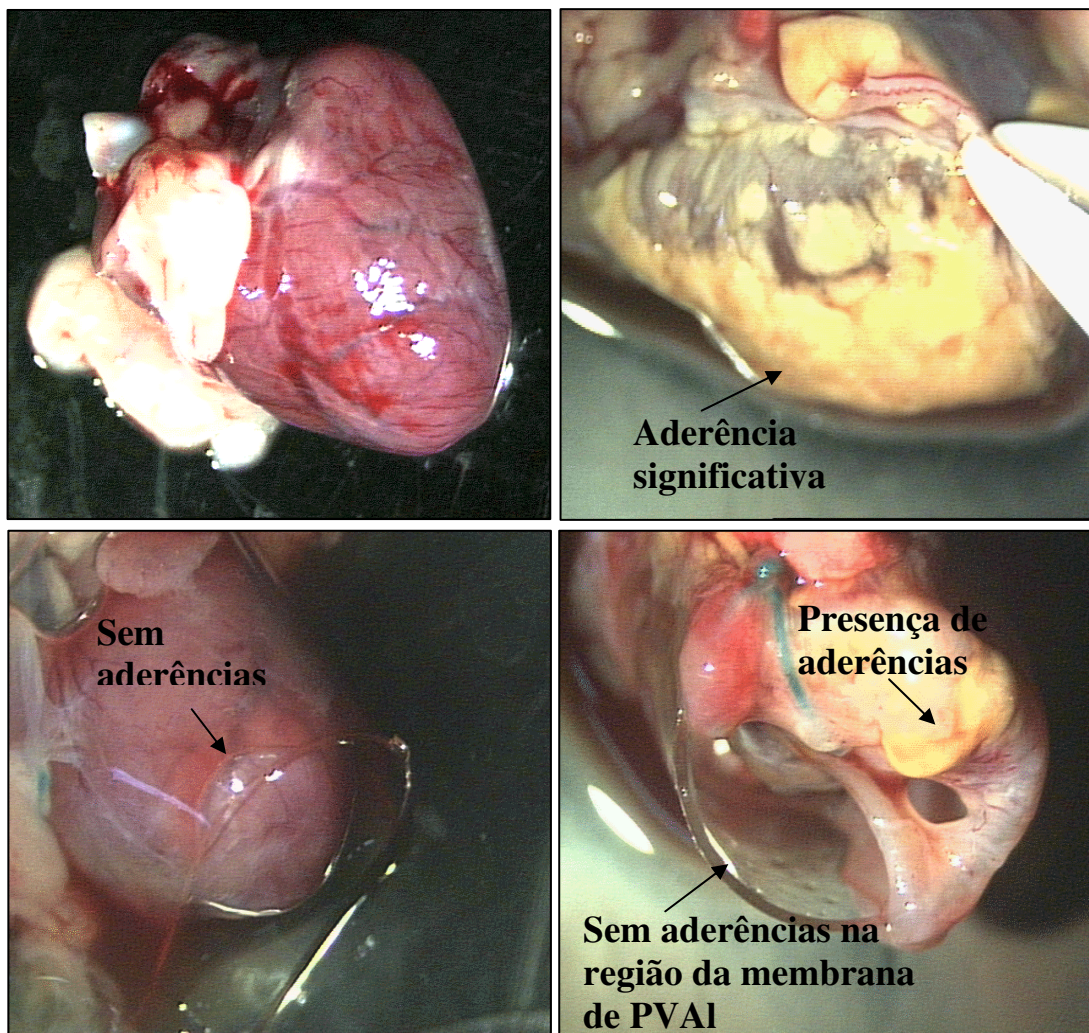


Figura 2- Fotos dos corações dos animais após oito semanas de intervenção, imediatamente após a eutanásia (aumento de duas vezes). A - Grupo Controle, B - Grupo Talco, C - Grupo PVAI e D - Grupo PVAI + Talco.

5- Análise Microscópica

5.1- Espessura Epicárdica

A espessura epicárdica média do grupo controle foi de $159,5 \pm 292,3 \mu\text{m}$ (IC 95%: -26,27 a $345,2 \mu\text{m}$), a do grupo talco de $196,6 \pm 217,7 \mu\text{m}$ (IC 95%: 88,36 a $04,9 \mu\text{m}$), a do grupo PVAI de $364,9 \pm 161,4 \mu\text{m}$ (IC 95%: 275,5 a $454,3 \mu\text{m}$) e a do grupo PVAI + talco de $787,7 \pm 368,5 \mu\text{m}$ (IC 95%: 583,7 a $991,8 \mu\text{m}$) (Gráfico 3).

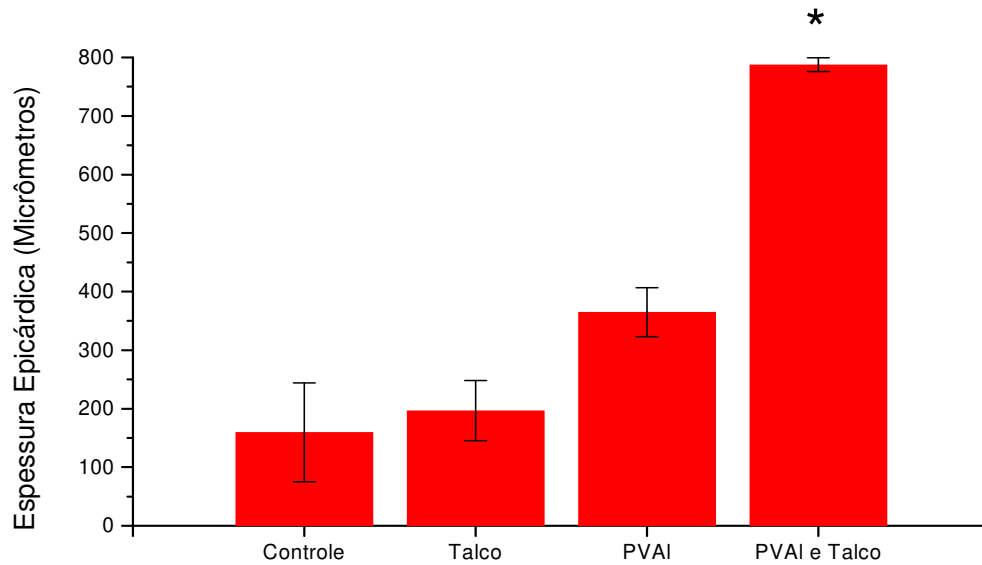


Gráfico 3- Espessuras do epicárdio por grupo. Valores expressos em média e dois erros padrão da média. (*) diferença com significância estatística em relação ao grupo controle ($p < 0,05$).

Houve diferença com significância estatística em relação ao grupo controle apenas do grupo PVAI + talco, como demonstrado no gráfico acima.

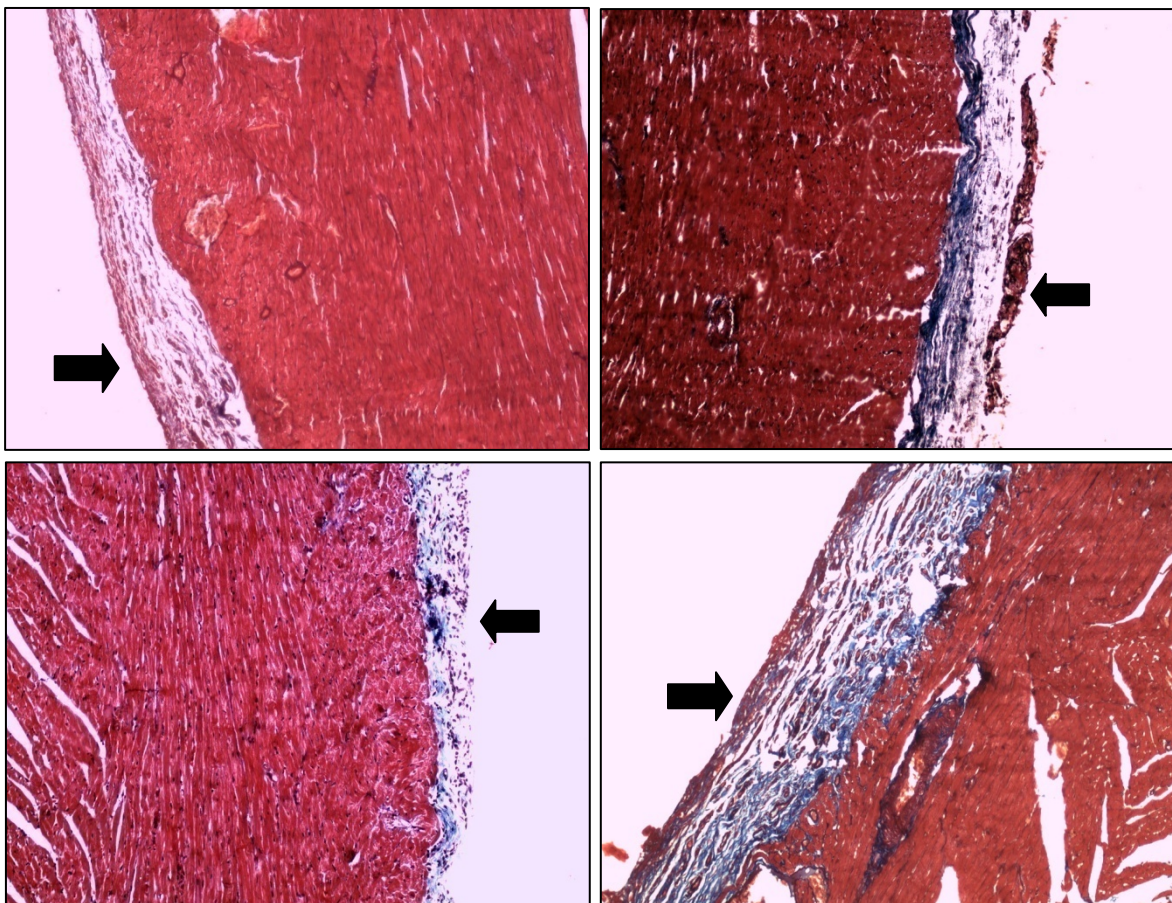


Figura 3- Fotomicrografia dos cortes histológicos dos corações corados pelo Tricrômio de Masson, observados à microscopia óptica convencional com objetiva de 10X. **A-** Grupo controle, **B-** Grupo Talco, **C-** Grupo PVAI e **D-** Grupo PVAI + Talco. Observar a espessura camada epicárdica (Setas).

5.2- Número de Células Inflamatórias

O número médio de células inflamatórias por campo do grupo controle foi de $2,75 \pm 5,21$ células (IC 95%: -0,56 a 6,06 células), o do grupo talco de $62,83 \pm 90,09$ células (IC 95%: 18,03 a 107,6 células), o do grupo PVAI de $43,53 \pm 26,19$ células (IC 95%: 275,5 a 454,3 células) e o do grupo PVAI + talco de $68,33 \pm 45,22$ células (IC 95%: 43,29 a 93,38 células) (Gráfico 4).

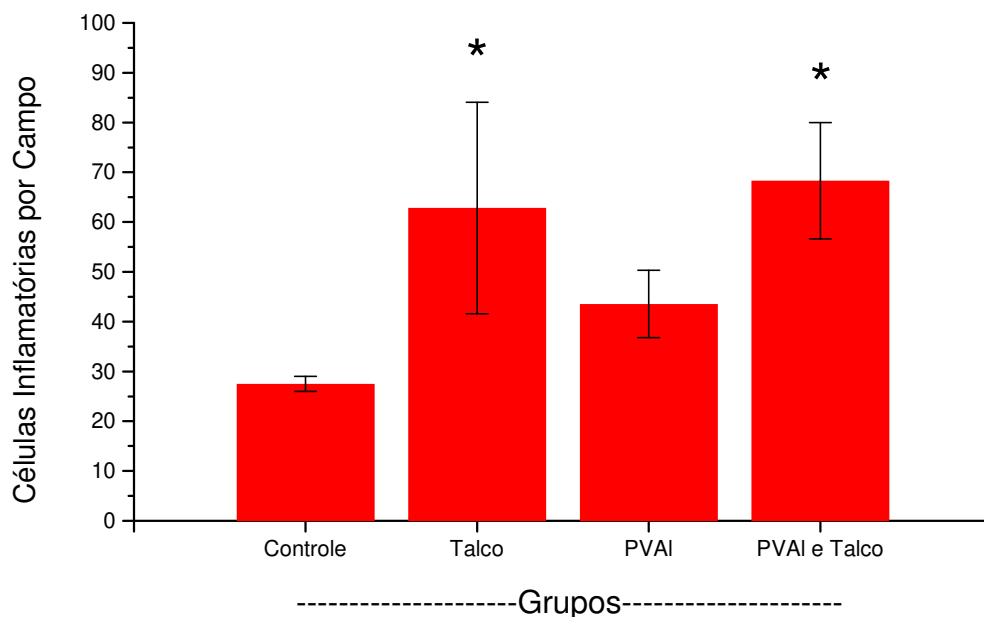


Gráfico 4- Número de células inflamatórias por grupo. Valores expressos em média e dois erros padrão da média. (*) diferença com significância estatística em relação ao grupo controle ($p < 0,05$).

Como demonstrado no gráfico acima, houve diferença com significância estatística em relação ao grupo controle nos grupos talco e PVAI + talco.

6- Observações histológicas

Grupo controle (figura 4-A): O epicárdio está com mesotélio presente e preservado, camada subepicárdica com trama delicada e fibras de colágeno Tipo III com presença de fibroblastos e fibrócitos.

Grupo talco (figura 4-B): Há intensa reação inflamatória crônica, com presença de linfócitos, plasmócitos e de macrófagos ativados fagocitando material particulado, com arranjos nucleares sugerindo aparecimento de células gigantes do tipo corpo estranho (setas).

Grupo PVAI (figura 4-C): O mesotélio está preservado. A camada subepicárdica se apresenta mais espessada devido ao aumento de matriz extracelular formada por substância fundamental, fibras conjuntivas principalmente por colágeno tipo

III, com grande regularidade. Há presença de macrófagos ativos e inativos, infiltrado linfoplasmocitário, fibroblastos e fibrócitos.

Grupo PVAI + talco (figura 4-D): O epicárdio se apresenta bastante espessado devido à fibrose e reação inflamatória onde são vistos: fibroblastos e fibrócitos, polimorfonucleares, macrófagos ativos e inativos, células gigantes tipo corpo estranho (seta), linfócitos e plasmócitos.

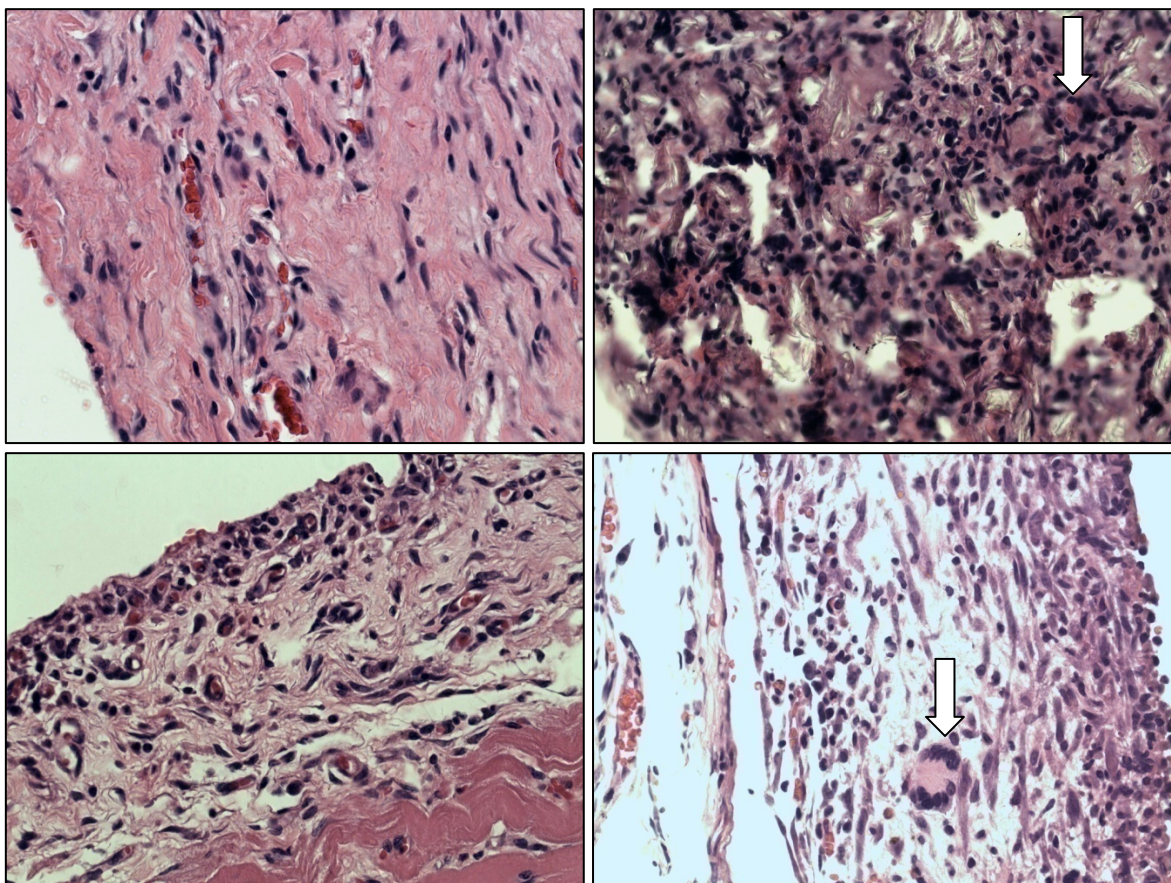


Figura 4- Fotomicrografia dos cortes histológicos dos corações corados pela Hematoxilina e Eosina, observados em microscópio convencional com objetiva de 40 X. **A-** Grupo controle, **B-** Grupo Talco, **C-** Grupo PVAI e **D-** Grupo PVAI + Talco.



DISCUSSÃO

Lesões teciduais ocorrem inevitavelmente em todos os procedimentos cirúrgicos devido ao trauma direto ao se cortar, manipular e suturar. Lesões indiretas nos tecidos adjacentes ao campo operatório também ocorrem, pela dissecação, lesões térmicas ou à abrasão. Cliff et al. (1973) analisando histologicamente o pericárdio de animais submetidos à operações cardíacas indicaram que as lesões ao mesotélio são indutoras de formação de aderências.

O desenvolvimento de aderências pericárdicas pós-operatórias é relacionado ao aumento do risco das reoperações em cirurgias cardiovasculares, devido ao dano potencial ao coração, grandes vasos ou enxertos, além de problemas relacionados ao tempo operatório prolongado, sangramento aumentado e infecções (O'Brien et al. 2001).

Segundo Nkere et al. (1994), nas áreas de lesões do mesotélio pericárdico há deposição de fibrina, resultando inicialmente, em aderências tênues entre o epicárdio e o pericárdio. Subseqüentemente, se estas aderências não são quebradas, elas se organizam em aderências fibrosas devido à síntese de tecido conectivo patológico por fibroblastos ativados. Análises histológicas do pericárdio de pacientes submetidos à cirurgia cardíaca demonstraram eventos iniciais similares a estes descritos, com diminuição da atividade fibrinolítica mesotelial, acúmulo de fibrina e alterações inflamatórias decorrentes da lesão mesotelial.

Muitas técnicas têm sido descritas para reduzir o risco de formação de aderências pericárdicas, destacando o uso de substitutos pericárdicos obtidos a partir de materiais biológicos ou sintéticos. Entre os biológicos, muitos investigadores têm relatado a eficácia do pericárdio heterólogo, incluindo o equino e bovino (Heydorn et al., 1987; Meus et al., 1983; Gabbay et al. 1989) Entretanto estas membranas também podem induzir aderências ou mesmo se calcificarem (Gallo et al., 1982; Gabbay et al., 1989).

No grupo de materiais sintéticos podemos citar a borracha siliconizada, filme de polietileno (PE), tela de dacron e membrana de politetrafluoretileno expandido (PTFE). Este último, que apesar de ter sido descrito como efetivo, ainda tem uso clínico limitado devido à indução de cápsula fibrótica, o que causa preocupação (Laks et al., 1981; Meus et al., 1983; Revuelta et al., 1985; Tsukhiara et al., 2005).

Uma desvantagem dos materiais acima citados é que todos, biológicos ou sintéticos, são opacos. O fato de eles não serem transparentes certamente interfere na visualização da arquitetura cardíaca e dos enxertos previamente realizados, dificultando a reabordagem.

Os hidrogéis são polímeros sintéticos hidrofílicos, capazes de absorver água sem se dissolver. Suas propriedades mecânicas irão depender de diversos fatores como o tipo de monômero, a densidade da reticulação de sua estrutura final, da concentração do agente de reticulação e da capacidade de absorção de água entre outras. Os hidrogéis de PVAI são biomateriais inertes sendo permeáveis a metabólitos, inabsorvíveis, esterilizáveis, podem ser obtidos em uma variedade de espessuras e formas, além de apresentarem similaridades físicas com os tecidos moles do organismo (Ratner, 1996). Por isso, nas últimas décadas essa classe de materiais tem recebido atenção devido a sua excepcional promessa em aplicação biomédica, já sendo reconhecidamente utilizados como componentes de lentes de contato hidrofílicas, bandagens, próteses mamárias e cartilagens articulares.

Além das características já descritas, os hidrogéis de poli (álcool vinílico) - PVAI reticulados por irradiação, têm propriedades particulares que os tornam interessantes. Devido ao processo de reticulação ser gerado via irradiação de feixe de elétrons, não havendo a necessidade de agente químico de reticulação, o hidrogel tem grau de pureza excelente, livre de outras moléculas que poderiam alterar suas propriedades como biomaterial. A densidade de reticulação que interferirá diretamente na capacidade de absorção de água, é facilmente controlada alterando a intensidade irradiação, estando o material estéril ao fim do processo. Somado a estas vantagens, os hidrogéis de PVAI têm baixa adesividade e elevada transparência, o que os tornam atrativos para serem utilizados como substituto pericárdico, já que além de evitar a formação de aderências, não dificultaria a visualização das estruturas epicárdicas em caso de reoperação.

No presente trabalho, para se avaliar a possibilidade de se utilizar a membrana de PVAI reticulada por irradiação de feixe de elétrons como substituto pericárdico, ensaios com a mesma foram realizados para caracterizá-la, além dos protocolos previamente descritos na metodologia. Para facilitar a discussão, esta será dividida de acordo com os parâmetros estudados.

1- Citotoxicidade

Uma definição simples para biomaterial é aquele utilizado para restaurar a funcionalidade de um tecido ou órgão natural danificado e é esperado que ele realize sua função sem causar efeitos adversos nas outras partes do organismo (Batchelor, 2004). Para tal, uma característica essencial é a ausência de citotoxicidade.

Neste estudo, conforme descrito na metodologia, foram feitos ensaios de citotoxicidade indireta e direta da membrana de PVAI, comparando com os grupos controles positivo e negativo para citotoxicidade.

Houve diferença estatística entre ambos os ensaios de citotoxicidade em comparação ao controle positivo no qual foi utilizado o fenol, substância sabidamente citotóxica. Isto mostra que o PVAI não é citotóxico, visto que não impediu o crescimento celular nem de modo direto quando as células foram colocadas em cultura sobre sua superfície, nem de modo indireto quando foi colocado o extrato da membrana no meio de cultura.

Quando comparamos os ensaios de citotoxicidade com o grupo controle negativo, onde as células foram cultivadas em presença de poliestireno (substância inerte), também houve diferença estatística. Isto classifica o PVAI como citoestático, ou seja, retarda a velocidade crescimento celular mas não o impede, não sendo portanto, citotóxico.

Ao se observar as culturas de células em contraste de fase na microscopia com luz invertida, a semelhança do aspecto geral da cultura e da morfologia das células entre os ensaios de citotoxicidade do PVAI e o grupo controle negativo são nítidas, assim como a diferença do grupo controle positivo com os demais, reforçando a ausência de citotoxicidade da membrana de PVAI.

2- Capacidade de absorção de água

A membrana de poli (álcool vinílico) - PVAI obtida pelo processo de irradiação tem como característica a alta capacidade de hidratação, fato demonstrado pela análise da capacidade de absorção de água (Equilibrium Water Content - EWC) de 42,4% em média.

A densidade de reticulação obtida através do processo de irradiação possibilitou este desempenho.

3- Análise da quantidade de cálcio após implante *in vivo*

No nosso material, a análise da quantidade de cálcio presente nas membranas de PVAI após um período de implante *in vivo* de 28 dias mostrou um valor desprezível. Isto demonstra que as membranas de poli (álcool vinílico) implantadas permaneceram livres de calcificação, o que é uma característica muito favorável à aplicação desejada. Outros autores como Gallo et al. (1982) e Gabay et al. (1989) descreveram calcificação dos implantes de pericárdio heterólogo utilizados como substitutos pericárdicos. A calcificação do substituto pericárdio certamente dificulta uma futura reabordagem do coração.

4- Análise macroscópica

O talco é um material sabidamente indutor de aderências, sendo a principal substância para realização de pleurodese como em casos de derrame pleural por neoplasias (Davies et al., 2008). Ele foi utilizado no trabalho com a intenção de se ter um grupo controle positivo para aderências, resultado confirmado pela diferença do grupo talco na indução de aderências em relação aos demais grupos.

O grupo PVAI não foi diferente do grupo controle, mostrando que a membrana de PVAI não induziu formação de aderências, além do mais na observação macroscópica os corações revestidos pela membrana, a superfície epicárdica permaneceu lisa, transparente, sendo possível observar os vasos coronarianos.

No grupo PVAI e talco também não foi observada diferença com significância estatística em relação ao grupo controle. Era esperado que o talco desencadeasse a formação de aderências, porém elas apareceram apenas em regiões do coração fora da área revestida pela membrana de PVAI, o que nos leva a concluir que de certo modo a membrana preveniu o aparecimento das traves fibrosas.

Nas últimas décadas a membrana de PTFE expandido é a mais citada na literatura com substituto pericárdico. Ela protege o coração da serra para esternotomia, contudo induz reação inflamatória epicárdica, às vezes intensa, dependendo da porosidade da membrana, com fibrose difusa e relatos de deformação da própria membrana decorrente da densidade do tecido fibroso (Meus et al., 1983; Revuelta et al., 1985; Lu et al., 1998). No presente estudo, de modo oposto, a membrana de PVAI não induziu formação de aderências, além de ter a vantagem de ser transparente, permitindo a visualização das estruturas epicárdicas.

5- Análise microscópica

O talco induz reação inflamatória intensa, com liberação de vários fatores inflamatórios pelas próprias células mesoteliais como descrito por Acencio et al. (2007) em trabalho experimental com cultura de células mesoteliais de coelhos. Os autores descreveram aumento significativo dos níveis de interleucina 8 (IL-8), fator de crescimento endotelial (VEGF) e fator de crescimento beta (1TGF-beta1) nas culturas de células mesoteliais pleurais expostas ao talco. De modo análogo, o mesotélio pericárdico em contato com o talco deve liberar estas citocinas, induzindo a migração de grande quantidade de células inflamatórias para o epicárdio.

Em nosso material, este fato pode ser observado na histologia dos dois grupos expostos ao talco, com desenvolvimento de resposta inflamatória crônica, havendo presença de grande número de linfócitos, plasmócitos, mastócitos ativados e células gigantes, caracterizando reação inflamatória crônica do tipo corpo estranho. Na análise estatística isto pode ser confirmado pelo aumento com significância do número de células inflamatórias por campo dos grupos talco e PVAI e talco em relação aos grupos controle e PVAI.

Quanto à espessura do epicárdio, foi detectado aumento com significância estatística apenas no grupo PVAI e talco, provavelmente devido ao fato deste ter sofrido pelo menos três estímulos indutores de reação inflamatória com subsequente fibrose: a própria pericardiotomia com abrasão do epicárdio, as presenças do talco e da membrana de PVAI.

Nos corações do grupo PVAI não houve aumento com significância estatística da espessura epicárdica nem do número de células inflamatórias por campo em relação ao grupo controle, reforçando a característica do material em ser bioinerte. Entretanto, observando os cortes histológicos, nota-se a presença de infiltrado inflamatório crônico, este muito mais discreto que nos grupos expostos ao talco. Outra observação que deve ser destacada é a ausência de células gigantes, não havendo caracterização de reação do tipo corpo estranho, fato necessário para o material ser classificado como bioinerte.

6- Considerações finais

No presente estudo, a membrana de poli (álcool vinílico) - PVAI mostrou um comportamento biológico desejável, sem citotoxicidade, não se calcifica, não induz formação de aderências entre ela e o epicárdio, além de não induzir reação inflamatória do tipo corpo estranho, sendo um biomaterial promissor como substituto pericárdico.

Algumas limitações do estudo devem ser destacadas. Os achados experimentais não são completamente reprodutíveis clinicamente, pois o pericárdio murino é extremamente delgado e de difícil manuseio, o sangramento foi mínimo e não foi realizada circulação extracorpórea.

Para mimetizar a situação clínica, é necessário o desenvolvimento de outros modelos experimentais, em outras espécies nas quais o pericárdio é mais espesso, com outras variáveis como o tempo de observação, uso de circulação extracorpórea, sangramento e maior dano ao epicárdio.

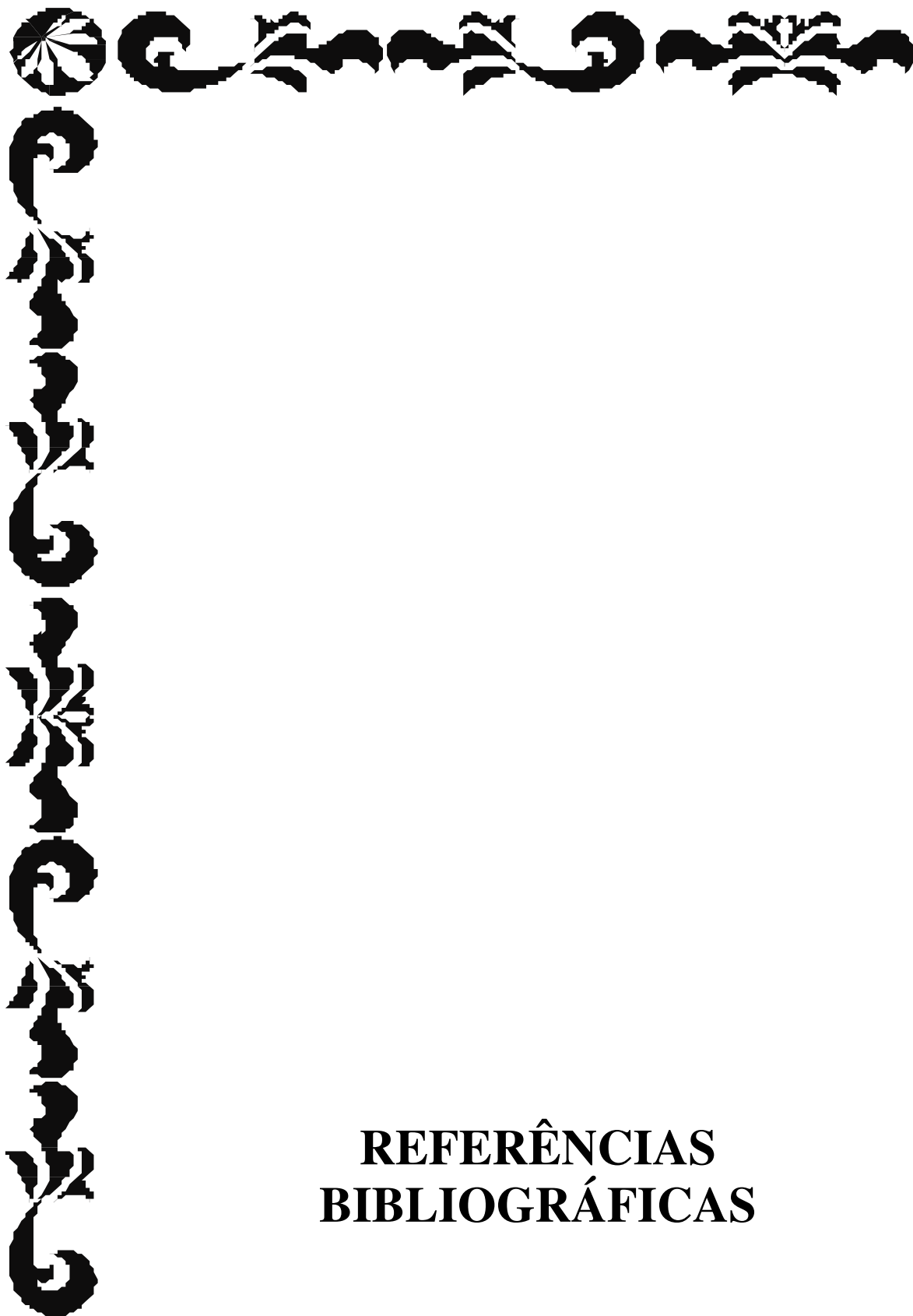
Com relação às características da membrana de PVAI, pode-se estudar membranas de diferentes graus de reticulação, com capacidades variáveis de absorção de água, com impregnação de fármacos, entre outras, abrindo um campo vasto para a experimentação e aprimoramento do biomaterial.



CONCLUSÃO

A membrana de poli (álcool vínico) - PVAI

- Apresenta boa capacidade de absorção de água, calcificação desprezível após o implante in vivo por quatro semanas e não apresenta citotoxicidade nas células VERO.
- Não induziu formação de aderências pericárdicas, não provocou aumento da espessura epicárdica e não induziu aumento de migração de células de resposta inflamatória para o epicárdio.



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Acencio MM, Vargas FS, Marchi E, Carnevale GG, Teixeira LR, Antonangelo L, Broaddus VC. Pleural mesotelial cells mediate inflammatory and profibrotic responses in talc-induced pleurodesis. *Lung* 2007; 185(6): 343-8.

Batchelor A. Service Characteristics of Biomedical Materials and Implants: Series on Biomaterials and Bioengineering – Vol.3. London. Imperial College Press; 2004.

Bavaresco VP. Estudo tribológico de hidrogéis poliméricos para serem utilizados como cartilagem articular artificial. [Tese - Doutorado]. Campinas (SP): Universidade Estadual de Campinas; 2004.

Bonnabeau RC, Armanious AW, Tarnay TS. Partial replacement of pericardium with dura substitute. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1973; 66:196-201 apud Laks H, Hammond G, Geha AS. Use of silicone rubber as a pericardial substitute to facilitate reoperation in cardiac surgery. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1981; 82:88-92.

Brown AH, Braimbridge MV, Saber EF. The complications of media sternotomy. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1969; 58: 189.

Burczak K et al. Protein permeation through polyvinyl alcohol hydrogel membranes. *Biomater* 1994; 15:231-8.

Cliff WJ, Groberty J, Ryan GB. Postoperative pericardial adhesions. The role of mild serosal injury and spilled blood. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1972; 65:744-50.

Connors RC, Muir BAJ, Liu Y, Reiss R, Kouretas PC, Whitten MG et al. Postoperative pericardial adhesion prevention using Carbylan-SX in a rabbit model. *JSurg Res* 2007; 140:237-42.

Culliford AT, Spencer FC. Guidelines for safely opening a previous sternotomy incision. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1979; 78:633-8.

Darwis D, Syasica P, Razzak MT, Rosiaki JM. Characterization of poly(vinyl alcohol) hydrogel for prosthetic intervertebral disc nucleus. *Radiation Physics and Chemistry*, 2002; 63: 539-42.

Davies HE, Lee YCG, Davies RJO. Pleurodesis for malignant pleural effusion: talc, toxicity and where next? *Thorax* 2008; 63: 572-4.

Dobell AR, Jain AK. Catastrophic hemorrhage during redo sternotomy. *Ann Thorac Surg*. 1984; 37: 273-84.

Gabbay S, Guindy AM, Andrews JF, Amato JJ, Seaver P, Khan MY. New outlook on pericardial substitution after open heart operations. *Ann Thorac Surg* 1989; 48:803-12.

Gallo JJ, Pomar JL, Artiñano E, Duran CMG. Heterologous pericardium for the closure of pericardial defects. *Ann Thorac Surg*, 1978; 26:149-154.

Gallo JJ, Artinano E, Duran CMG. Clinical experience with glutaraldehyde-preserved pericardium for the closure of the pericardium after open heart surgery. *Thorac Cardiovasc Surg* 1982; 30:306-9.

Hassan CM, Ward JH, Peppas NA. Modeling of crystal dissolution of poly(vinyl alcohol) gels produced by freezing/thawing processes. *Polymer* 1999; 41: 6729-39.

Jiang H, Campbell G, Boughner D, Wan WK, Quantz M. *Med Eng Phys* 2004, 26(4): 269-77.

Heydorn WH, Daniel JS, Wade CE. A new look at pericardial substitutes. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1987; 94: 291-6.

Julian OC, Lopez-Belio M, Dye WS, Javid H, Grove WJ. The median sternal incision in intracardiac surgery. *Surgery* 1957; 42: 753 apud Culliford AT, Spencer FC. Guidelines for safely opening a previous sternotomy incision. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1979; 78:633-8.

Kajihara N, Eto M, Oishi Y, Boku N, Kuwahara K, Nishiguchi N et al. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2005; 129:18-24.

Kirkpatrick CJ. Biological testing of materials and medical devices - A critical view of current and proposed methodologies for biocompatibility testing: cytotoxicity in vitro. *Reg Aff* 1992; 4:13-32.

Kobayashi M, Togushida J, Oka M. Development of the shields for tendon injury repair using polyvinyl alcohol – hidrogel (PVA-H). *J Biomed Mater Res (Appl Biomater)* 2001, 58:344-51.

Kobayashi M, Togushida J, Oka M. Development of an artificial meniscus using polyvinyl alcohol – hydrogel for early return to, and continuance of, athletic life in sports persons with severe meniscus injury. I: mechanical evaluation. *The Knee*, 2003, 10:47-51.

Kohanna FH, Adams PX, Cunningham JN. Use of autologus fascia lata as pericardial substitute following open-heart surgery. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1977; 74:14-9.

Laks H, Hammond G, Geha AS. Use of silicone rubber as a pericardial substitute to facilitate reoperation in cardiac surgery. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1981; 82:88-92.

Lu JH, Chang Y, Sung HW, Chiu YT, Yang PC, Hwang B. Heparinization on pericardial substiutes can reduce adhesion and epicardial inflammation in the dog. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1998; 115:1111-20.

Macmanus Q, Okies JE, Steven J. Phillips, Starr A. Surgical considerations in patients undergoing repeat median sternotomy. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1975; 69(1): 138-143.

Mazuji MK, Lett JC; Siliconized Dacron as pericardial patch. *Arch Surg* 1963; 87:446-9 apud Revuelta JM, Garcia-Rinaldi R, Val F, Crego R, Duran CMG. Expanded polytetraethylene surgical membrane for pericardial closure. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1985; 89:451-5.

Mathisen SR, Wu HD, Sauvage LR, Walker MW. Prevention of retrosternal adhesions after pericardiotomy. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1986; 92:92-8.

Meus PJ, Wernly JA, Campbell CD, TakanashiY, Pick RL, Zhao-Kun Q. Long-term evaluation of pericardial substitutes. *J Thorac Carviovasc Surg* 1983; 85:54-8.

Mitchell JD, Lee R. Prevention of postoperative pericardial adhesions with hyaluronic acid coating solution. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1994; 107:1491.

Mondino AV, Gongalez ME, Romero GR, Smolko EE. Physical properties gamma irradiated poly(vinil alcohol) hydrogel preparations. *Radiation Physics and Chemistry* 1999; 55:723-726.

Nkere UU, Whawell SA, Sarraf CC, Schoefield JB, Thompson JN, Taylor KM. Perioperative histologic and ultrastructural changes in pericardium and adhesions. *Ann Thorac Surg* 1994; 58:437-44.

O'Brien MF, Harrocks S, Clarke A, Garlik B, Barnett AG. How to do safe sterna reentry and the risk factors of redo cardiac surgery: a 21-year review with zero major cardiac injury. *J Cardiac Surg* 2001; 17:4-13.

Oka M. Development of artificial articular cartilage. *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers Part H-Journal of Engineering in Medicine* 2000; 214(H1):59-68.

Pacholewicz JK, Daloisio C, Shawarby AO, Dharan SM, Gu J, MacGrath LB. Efficacy of autologous peritoneum as biological membrane in cardiac surgery. *Eur J Cardiothorac Surg* 1994; 8(10):563-5.

Peppas NA et al. Development of semi-crystalline polyvinyl alcohol hydrogels for biomedical applications. *J Biomed Mater Res* 1977; 11:423-34.

Peppas NA, Kormsmeier RW. *Hydrogels in medicine and pharmacology*. Boca Raton: CRC Press; 1987.

Ratner BD. Biomedical applications of hydrogels: review and critical appraisal. In: Willians DF. *Biocompatibility of clinical implant materials Vol II*. Boca Raton: CRC Press; 1981. p.145-75.

Ratner BD. *Biomaterial Science: An Introduction to Materials in Medicine*. London: Academic Press; 1996. p. 60-4.

Revuelta JM, Garcia-Rinaldi R, Val F, Crego R, Duran CMG. Expanded polytetraethylene surgical membrane for pericardial closure. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1985; 89:451-5.

Schechter FG, Owens RR, Bryant LR. Pleural flap closure of pericardial defects following intrapericardial pneumonectomy. *Ann Thorac Surg* 1976; 21:67-9.

Sjogren G., Sletten G, Dahl J.E. Cytotoxicity of dental alloys, metals and ceramics assessed by Millipore filter, agar overlay and MTT tests. *J Prosthet. Dent* 2000; 84: 229-236.

Shii F, Makuuchi K, Darwis D, Razzak MT. Heat assistance poly (vinyl alcohol) Hydrogel. *Rad Physic Chem* 1995; 46: 169-174.

Tisukihara H, Takamoto S, Kitahori K, Matsuda K, Murakami A, Novick RJ, Suematsu Y. Prevention do postoperative pericardial adhesions with a novel regenerate collagen sheet. *Ann Thorac Surg* 2006; 81:650-7.

Wan WK, Campbell G, Zhang ZF, Hui AJ, Boughner DR. Optimizing the tensile properties of polyvinil alcohol hydrogel for the construction of a bioprosthetic heart valve stent. *J Biomed Mater Res* 2002; 63(6):854-61.

Wang ND, Doty DB, Doty JR, Yuksel D, Flinner R. Bioglue: A protective barrier after pericardiotomy. *J Card Surg* 2007;22:295-9.

Yau TM, Borger MA, Weisel RD, Ivanov J. The changing pattern of reoperative coronary surgery: trends in 1230 consecutives reoperations. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2000; 120:156-63.

Youmans CR, White J, Derrick JR. The prevention of pleural and pericardial adhesions with Silastic. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1968; 55:383-8 apud Mathisen SR, Wu HD, Sauvage LR, Walker MW. Prevention of retrosternal adhesions after pericardiotomy. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1986; 92:92-8.



ANEXO

Fórmula estrutural do poli (álcool vinílico) - PVAI

